

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. April 2004 (15.04.2004)

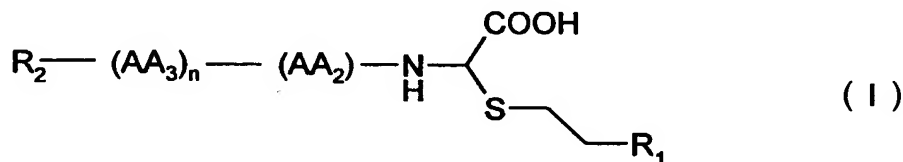
PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/031216 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 5/06, 5/08, C12Q 1/56
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH2002/000670
- (22) Internationales Anmeldedatum:
6. Dezember 2002 (06.12.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
PCT/CH02/00553 4. Oktober 2002 (04.10.2002) CH
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PENTAPHARM AG [CH/CH]; Engelgasse 109, CH-4052 Basel (CH).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZIEGLER, Hugo [CH/CH]; Im Bohnacker 15, CH-4108 Witterswil (CH). PRASA, Dagmar [DE/DE]; Backhausstr. 12, 99094 Erfurt (DE). STÜRZEBECKER, Jörg [DE/DE]; Hubertusstrasse 38, 99094 Erfurt (DE). WIKSTROEM, Peter [SE/CH]; Obere Egg 3, CH-5073 Gipf-Oberfrick (CH).
- (74) Anwalt: BRAUN, André; Braun & Partner, Reussstrasse 22, CH-4054 Basel (CH).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT (Gebrauchsmuster), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (Gebrauchsmuster), DE (Gebrauchsmuster), DK (Gebrauchsmuster), DM, DZ, EC, EE (Gebrauchsmuster), ES, FI (Gebrauchsmuster), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK (Gebrauchsmuster), SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SUBSTRATE FOR TAFI (A)

(54) Bezeichnung: SUBSTRATE FÜR TAFI (A)



(57) Abstract: The invention relates to compounds of general formula (I) and acid addition salts thereof, where the various symbols have the meanings given in the description and claims, the production and use thereof as substrate for the detection of TAFIa, a fibrinolysis inhibiting enzyme. The detection occurs by using the absorption between 400 and 412 nm, arising as a result of the formation of 3-carboxy-4-nitrothiophenol from Ellman's reagent as a function of time.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und Säureadditionssalze davon, worin die verschiedenen Symbole die in der Beschreibung und den Ansprüchen definierten Bedeutungen haben, deren Herstellung und deren Verwendung als Substrate zum Nachweis von TAFIa, einem die Fibrinolyse hemmenden Enzym. Der Nachweis erfolgt photospektrometrisch, indem die durch die Bildung von 3-Carboxy-4-nitrothiophenol aus dem Ellman's Reagens entstehende Absorption zwischen 400 und 412 nm in Abhängigkeit von der Zeit gemessen wird.

5 SUBSTRATE FÜR TAFI (A)

TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) ist ein der Carboxypeptidase B ähnliches Proenzym von 55 kDa, welches durch Proteolyse am Arg-92 zum Enzym TAFIa (35 kDa) aktiviert wird. Im Unterschied zur Carboxypeptidase B, welche als
10 Proenzym von 46 kDa durch Proteolyse am Arg-95 aktiviert wird und im Magen und Verdauungstrakt wirkt, ist TAFIa ein Leberenzym, das seine Wirksamkeit im Blut entfaltet.

TAFIa wird durch Thrombin und wahrscheinlich auch Plasmin aus TAFI gebildet und ist
15 ein wichtiger Inhibitor der Fibrinolyse. Die Aktivierung von TAFI wird durch die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin ungefähr 1250-fach verstärkt. Die inhibierende Wirkung von TAFIa beruht auf der Fähigkeit, Carboxy-terminale Arginine und Lysine abzuspalten, wobei die Spezifität gegenüber Arginin grösser ist.

20 TAFIa selbst ist gegenüber Proteolysen sehr empfindlich und bereits bei 37°C instabil.

Fibrinolyse beginnt, wenn Plasminogen durch tPA in Plasmin umgewandelt wird. Plasmin baut dann das Fibringerinnsel zu löslichen Fibrin-Produkten ab, die ihrerseits zu einer zusätzlichen Stimulierung der Plasminbildung beitragen. TAFIa spaltet die
25 Carboxy-terminalen Lysine dieser Fibrin Produkte ab, was zu einer Verhinderung der Bildung des tPA/Plasminogen/Fibrin-Komplexes führt, womit die Fibrinolyse gehemmt wird.

Die Messung der TAFIa-Konzentration im Plasma gibt einen wichtigen Hinweis zum
30 Blutungs- resp. Thromboserisiko von Patienten.

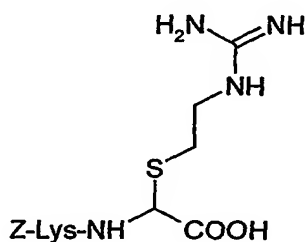
Eine Bestimmung von Carboxypeptidasen ist möglich mit immunologischen Tests, wie z.B. ELISA, welche aber nicht die Aktivität von TAFI erfassen. Funktionelle Tests sind beschrieben, worin TAFIa auf synthetische Substrate des Typs R-Arg-COOH oder R-

- 2 -

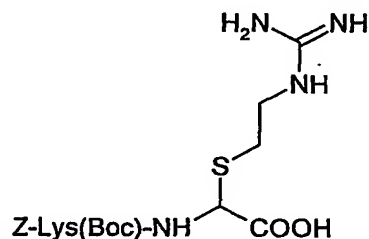
Lys-COOH einwirkt und dabei 'R' (z.B. Hippuryl) freisetzt, welches mittels HPLC oder spektrophotometrisch im nahem UV-Bereich gemessen werden kann.

Es gibt bisher erst einen chromogenen Assay für die Messung von TAFI und TAFIa im Plasma auf Mikrotiterplatten. Die Farbstoffbildung ist jedoch zu kompliziert (mehrstufig) und verläuft unbefriedigend. Da die Absorptionsmessung bei 490 nm vorgenommen wird, eignet er sich – wie auch die vorgängig beschriebenen Methoden – nicht für die Messung auf gängigen Automaten, in denen die Extinktionsänderungen bei 405 nm erfolgen.

Die Thiaarginin-Derivate der folgenden Formeln A und B



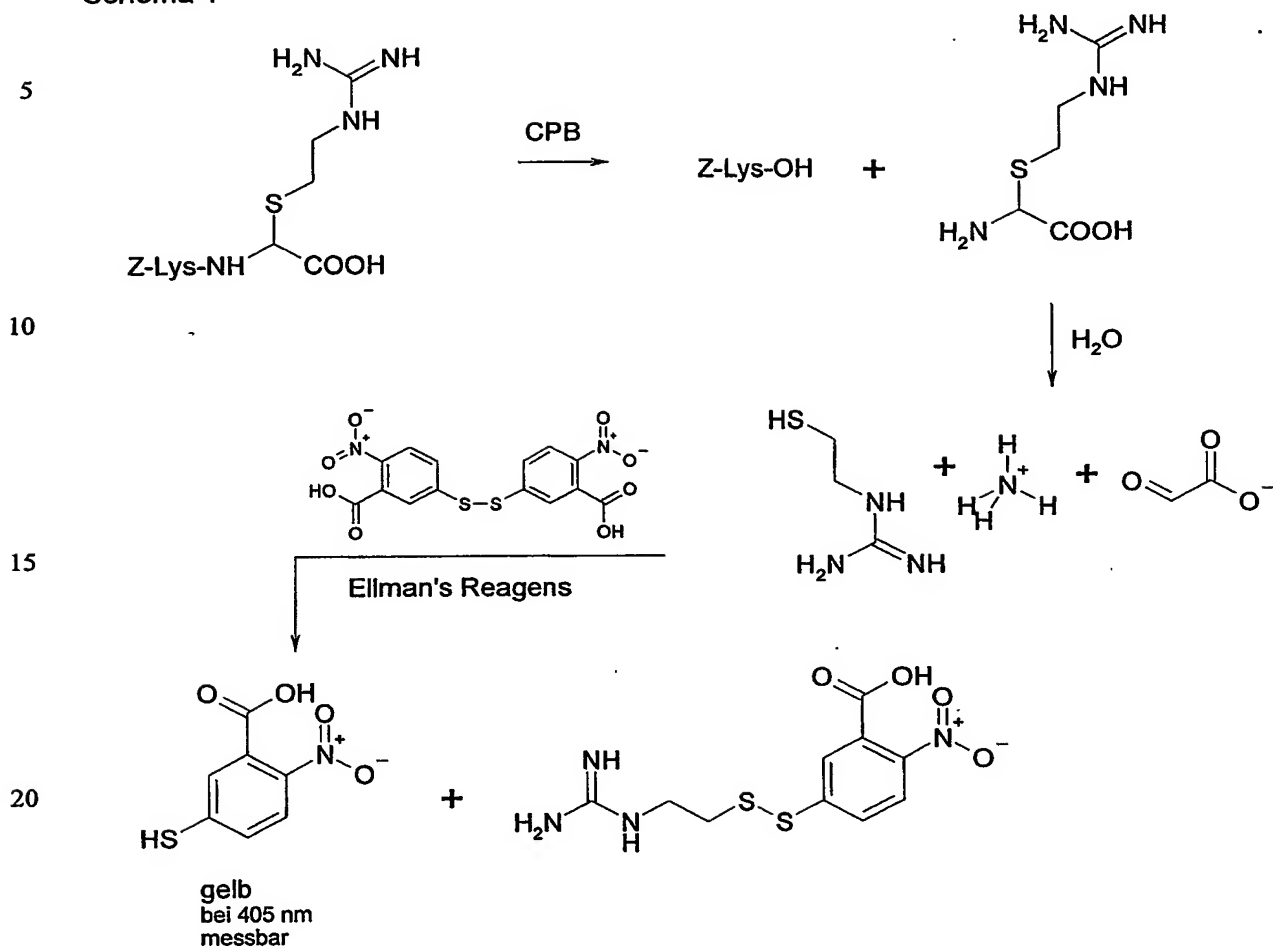
A



B

sind als Substrate für Carboxypeptidase B beschrieben worden (Bull. Korean. Chem. Soc. 1998, 19(2), 189-193). Diese Verbindungen zeigen bemerkenswerte Spaltungsraten durch Carboxypeptidase B (CPB), andererseits werden sie durch TAFIa kaum gespalten. Der Nachweis von CPB mittels Verbindung A erfolgt gemäss dem nachfolgenden Schema 1.

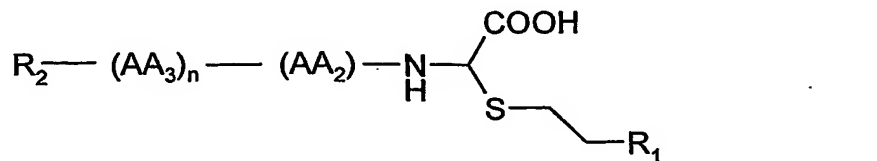
Schema 1



25 Überraschenderweise lässt sich diese Selektivität bereits durch kleine Strukturvariationen zu Gunsten von TAF1a umkehren.

Die vorliegende Erfindung betrifft neue TAF1a-Substrate der allgemeinen Formel I

30



worin

R_1 eine Gruppe CH_2NH_2 oder $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ bedeutet,

- 4 -

AA₂ jeweils unsubstituiertes oder substituiertes Lysin, Ornithin, Arginin oder Histidin bedeutet, wobei die Substituenten übliche Schutzgruppen sind,

AA₃ eine natürliche Aminosäure bedeutet, bei der eine allenfalls vorhandene schütz-
bare Gruppe in der Seitenkette durch eine übliche Schutzgruppe
substituiert sein kann,

n 0 oder 1 ist, und

R₂ eine Gruppe Bz, Bzl, Ac, Boc, Z, Suc, MeoSuc oder Tos bedeutet,
mit der Massgabe, dass nicht gleichzeitig n 0 ist und R₁ NHC(NH)NH₂, R₂ Z und (AA₂)
unsubstituiertes oder durch Boc substituiertes Lysin bedeuten,

als Racemate oder als enantiomerenreine Isomere,
und deren Salze mit Mineralsäuren oder organischen Säuren.

R₁ bedeutet vorzugsweise NHC(NH)NH₂.

Bevorzugte Bedeutungsmöglichkeiten für AA₂ sind z.B. Lys(ε-Z), Lys(ε-Boc), Lys(ε-Ac),
Lys(ε-Bz), Lys(ε-Bzl), Lys(ε-Tos), Orn(δ-Z), Orn(δ-Boc), Orn(δ-2-chlor-Z), Orn(δ-Dnp),
Orn(δ-Z), Orn(δ-Aloc), Arg(ω-Pbf), Arg(δ,ω-Boc)₂, Arg(δ,ω-Z)₂, Arg(ω-Tos), His(N^{im}-
Boc), His(N^{im}-Ac), His(N^{im}-Bz), His(N^{im}-Bzl) oder His(N^{im}-Tos), wobei Lys(ε-Z)
besonders bevorzugt ist.

Als Schutzgruppen in der Aminosäure AA₃ kommen z.B. tBu, Bzl oder Ac in Betracht,
wobei Phenylalanin, Alanin, Serin und Valin bevorzugte Aminosäuren sind.

R₂ bedeutet vorzugsweise Bz oder Boc.

Als Salze kommen z.B. Hydrobromide, Hydrochloride, Trifluoracetate oder Acetate in
Betracht, wobei Acetat- Trifluoracetat- und Hydrochlorid-Salze bevorzugt sind,

Die oben verwendeten Abkürzungen für Schutzgruppen sowie eine Reihe weiterer
Abkürzungen werden in einer zwischen Beispielen 2 und 3 eingefügten Tabelle
erläutert.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I, welche bezüglich dem mit dem Schwefel-
haltigen Substituenten versehenen asymmetrischen Kohlenstoff als Racemate oder in
einer ihrer enantiomerenreinen Formen D und L vorliegen können, lassen sich nach
den nachfolgend beschriebenen, an sich bekannten Methoden herstellen.

Geschützte Aminosäuren oder geschützte Oligopeptidderivate werden in die entsprechenden Säureamide übergeführt, und diese werden analog zu den von Hong, N.J. et al, Bull. Korean Chem. Soc. 1998, 19(2), 189-193 beschriebenen Verfahren mit
5 einem Alkylester der Glyoxylsäure, zweckmässigerweise einem C₁₋₆-Alkylester, wie Glyoxylsäureethylester, unter Rückfluss kondensiert. Die dabei entstandenen Hydroxyglycinderivate werden O-acetyliert und mit einer entsprechenden Mercaptoalkylverbindung, wie Cysteamin, 3-Mercaptopropylamin oder S-2-Aminoethylisothiuroniumbromid, substituiert. Die erhaltenen Alkylester der
10 Verbindungen der Formel I werden dann zu den entsprechenden freien Säuren alkalisch verseift. Die enantiomerenreinen Säuren können durch eine enantioselektive Hydrolyse der Ester mit Hilfe geeigneter Enzyme erhalten werden.

Die Verbindungen der Formel I und ihre Säureadditionssalze eignen sich als Substrate
15 für die Bestimmung von TAFIa. Diese Bestimmung kann erfindungsgemäss dadurch durchgeführt werden, dass man TAFIa in Gegenwart von 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure), unter der Bezeichnung "Ellman's Reagens" bekannt, auf eine Verbindung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7 einwirken lässt und die dabei durch die Bildung von 3-Carboxy-4-nitrothiophenol entstehende Absorption zwischen 400 und
20 412 nm in Abhängigkeit von der Zeit photospektrometisch ermittelt. Die erwähnte Einwirkung erfolgt zweckmässigerweise bei etwa 10°C bis 37°C, vorzugsweise bei Raumtemperatur, und die Einwirkungszeit kann etwa 5 bis 15 Minuten, vorzugsweise etwa 10 Minuten, betragen. Als Quelle für TAFIa kann das im Blutplasma vorhandene TAFI verwendet werden.

25 Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher illustrieren ohne ihren Umfang einzuschränken.

Die Identifizierung und Charakterisierung der gemäss Beispielen 1 und 2 erhaltenen
30 Eluate und Produkte wurde mittels Proton-NMR, HPLC-Elektrospray-MS und/oder Elementaranalyse ausgeführt.

Beispiel 1:

Herstellung von Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-(2-guanidinoethylthio)-glycin Hydrochloridsalz [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly (α-GUS)-OH • HCl]

5 1A) Benzoyl-(L)-lysyl(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-hydroxyglycine-ethylester
[Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-OH)-Oet]

5.0 g (13 mmol) Benzoyl-(L)-lysinamid und eine 50%-ige Toluollösung von 13.3 g (65 mmol) Glyoxylsäureethylester wurden in 100ml THF rückfliessend erhitzt. Nach 4h wurde die Lösung auf RT abgekühlt und direkt in den Reaktionsschritt 1B) überführt.

10

1B) Benzoyl-(L)-lysyl(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-acetoxyglycine-ethylester
[Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-Oac)-Oet]

Die Reaktionslösung aus 1A) wurde mit 127 mg (1 mmol) DMAP, 24.7 ml (0.31 mol) Pyridin und 40 g (0.39 mol) Essigsäureanhydrid versetzt und bei RT während 90 Min. gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Kieselgel filtriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Ausbeute: 14 g.

15

1C) Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-(2-guanidinoethylthio)-glycine
ethylester [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-GUS)-OEt]

20

5.5 g (19.5 mmol) S-(2-Aminoethyl)isothiuroniumbromid hydrobromid und 4 g (39 mmol) TEA wurden in 50 ml DMF gelöst und während 5 Min. bei RT gerührt. Dann wurde eine Lösung von 14 g des unter 1B) erhaltenen Produktes in 30 ml DMF zugegeben. Nach 2 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel am Rotovapor abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels LH20 (Methanol) chromatographiert. Die Verbindung fällt als gelbliches Öl an. ESI-MS [M+H]⁺– 587

25

1D) Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-(2-guanidinoethylthio)-glycine
Hydrochloridsalz [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-GUS)-OH • HCl]

30

3.1 g (4.4 mmol) der Verbindung 1C) wurden in 20 ml Ethanol gelöst, mit 11 ml NaOH (1N) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Nach Einstellen des pH's auf 3 mit Zitronensäure und Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand mittels LH20 (Methanol) chromatographiert. Zur Überführung in das Hydrochloridsalz wurden die reinen, eingengten Fraktionen in 100 ml eines Methanol/Wasser-Gemisches (1:1)

35

- 7 -

gelöst und über Amberlite (Cl⁻ Form) chromatographiert. Die erhaltene Lösung wurde am Rotovapor eingeeengt und das Produkt mittels Zugabe von BME als nahezu weisses, amorphes Pulver ausgefällt. Das Pulver wurde abfiltriert, mit wenig BME gewaschen und im Vakuumtrockenschrank getrocknet.

5 Ausbeute: 2.5 g, ESI-MS [M+H]⁺ – 559

Beispiel 2:

Herstellung von Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-(3-aminopropylthio)-glycine Trifluoressigsäuresalz [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-SprA)-OH • TFA]

10

2C) Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-(3-aminopropylthio)-glycine ethylester Trifluoressigsäuresalz [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-SprA)-Oet • TFA]

15

2.5 g (20 mmol) 3-Mercaptopropylamine hydrochlorid und 2 g (20 mmol) TEA wurden in 40 ml DMF gelöst, die Lösung während 5 min bei RT gerührt und mit einer Lösung von 6.9 g des unter 1B) erhaltenen Produktes in 30 ml DMF versetzt. Nach 2-stündigem Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel am Rotovapor abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC chromatographiert. (ACN/H₂O/TFA). Die reinen Fraktionen wurden am Rotovapor eingeeengt.

20

ESI-MS [M+H]⁺ – 559

2D) Benzoyl-(L)-lysyl-(ε-benzyloxycarbonyl)-α-(D,L)-(3-aminopropylthio)-glycine Trifluoressigsäuresalz [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-SprA)-OH • TFA]

25

0.43 g (0.6 mmol) der Verbindung 2C) wurden in 7 ml Ethanol gelöst, mit 2 ml NaOH (1N) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 10%-iger Zitronensäure auf pH 3 gestellt, 3 mal mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert und mit ges. NaCl-Lösung 2 mal gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotovapor abdestilliert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC chromatographiert (ACN/H₂O/TFA). Die reinen Fraktionen wurden am Rotovapor eingeeengt und der Rückstand in wenig Methanol gelöst und durch Zugabe von BME ausgefällt. Das nahezu weisse Pulver wurde abfiltriert, mit wenig BME gewaschen und im Vakuumtrockenschrank getrocknet.

30

ESI-MS [M+H]⁺ – 531

35

Abkürzungen

Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
Aloc	Allyloxycarbonyl
BME	t-Butyl methyl ether
Boc	t-Butyloxycarbonyl
Bz	Benzoyl
Bzl	Benzyl
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
Dnp	2,4-Dinitrophenyl
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
EtOAc	Ethylacetat
GUS	2-Guanidino-ethylthio
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
LH20	Sephadex
MeoSuc	Methoxysuccinyl
NAPAP	N α -(2-naphthylsulfonyl-glycyl)-4-amidinophenylalanine-piperidide
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-dibenzohydrofuran-5-sulfonyl
SprA	3-Aminopropylthio
RT	Raumtemperatur
Suc	Succinyl
tBu	tert.-Butyl
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tos	Tosyl
Z	Benzyloxycarbonyl

Beispiel 3:5 Quantitative Bestimmung von TAFIa

Prinzip: TAFIa wird analog zu Schema 1 bestimmt. In einem ersten Schritt wird das Substrat von TAFIa in der Weise hydrolysiert, dass eine Thioaminosäure (Thiaarginin

oder Thialysin) freigesetzt wird. Diese instabilen Zwischenprodukte werden rasch zu 2-Mercaptoethylguanidin resp. 3-Mercaptopropylamin abgebaut. Diese Mercaptoverbindungen reagieren mit dem Ellman's Reagens (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)) und setzen dabei das intensive gelbe 3-Carboxy-4-nitrothiophenol frei, welches photospektrometrisch bei 405-412 nm gemessen werden kann. Der gemessene Gehalt an freiem Thiol ist direkt proportional zur Menge des durch TAFIa hydrolysierten Substrats und ermöglicht damit eine quantitative Analyse der Enzym-Aktivität.

- 10 Enzym-Assay: Die Messung der Enzymaktivität wird unter Verwendung einer Substrat Stammlösung von 10 mM in DMSO bei Raumtemperatur durchgeführt. TAFI menschlichen Ursprungs ist in einer Stammlösung von 360 µg/ml bei Enzyme Research Laboratory oder über Blutplasma erhältlich. Die Aktivierung von TAFI zu TAFIa wurde mittels Thrombin (2.7U/ml), dessen Aktivierung mit 30 µg Thrombomodulin erfolgte, vorgenommen. Überschüssige Thrombinaktivität wurde durch Zugabe des synthetischen Inhibitors NAPAP eliminiert. Die Messung wurde auf Mikrotiterplatten durchgeführt.

Die Zunahme der Absorption bei 405-412 nm wurde während 10 Minuten aufgezeichnet.

20

Aktivierung:

TAFI	20	µl
Thrombin (2,7 E/ml)	20	µl
Thrombomodulin (30 µg/ml)	20	µl

- 25 in Puffer (20 mM HEPES, 5 mM CaCl₂, 0,01 % Tween 80; pH 7,4)
5 min bei 25 °C inkubieren

Messung:

Puffer (20 mM HEPES, 5 mM CaCl ₂ , 0,01 % Tween 80; pH 7,4)	120	µl
NAPAP (100 µM)	20	µl
DTNB (5 mM)	10	µl
Substrat (10 mM)	20	µl

bei RT 10 min messen

35

Resultate:

- Spaltung von Thiaarginin- und Thialysinsubstraten (Endkonzentration 174 μ M) durch TAFIa (Endkonzentration 17 μ g/ml)
- 5 - in Klammern die Werte für Carboxypeptidase B
- Vergleichssubstanzen A und B aus „Bull. Korean. Chem. Soc. 1998, 19(2), 189-193“
- ΔE = Änderung der Extinktion bei 405 nm

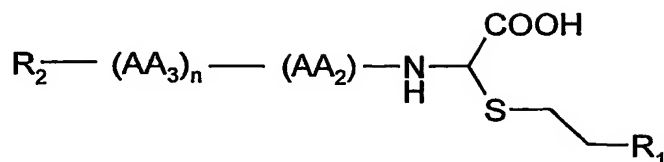
10 Tabelle 1

Nr.	Substrate	$\Delta E/\text{min}$
4269	Bz-K(Z)-G(GUS)-OH x HCl	0,108 (0,018)
4273	Boc-K(Tos)-G(GUS)-OH x HCl	0,014 (0,048)
4275	Boc-K(Z)-G(GUS)-OH x TFA	0,041 (0,028)
4298	Boc-F-K(Boc)-G(GUS)-OH x HCl	0,043 (0,034)
4300	Bz-P-K(Boc)-G(GUS)-OH x TFA	0,012 (0,072)
4302	Z-A-K(Boc)-G(GUS)-OH x HCl	0,042 (0,059)
4334	Bz-V-G(GUS)-OH x TFA	0,034
4336	Bz-V-G(α -SPrA)-OH x TFA	0,053
4339	Bz-K(Z)-G(α -SPrA)-OH x TFA	0,055
4341	Boc-K(Z)-G(α -SPrA)-OH x TFA	0,054
	Vergleichssubstanz A x HCl	0,002 (0,062)
	Vergleichssubstanz B x HCl	0,016 (0,077)

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel I

5



I

worin

R_1 eine Gruppe CH_2NH_2 oder $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ bedeutet,

AA_2 jeweils unsubstituiertes oder substituiertes Lysin, Ornithin, Arginin oder Histidin bedeutet, wobei die Substituenten übliche Schutzgruppen sind,

10

AA_3 eine natürliche Aminosäure bedeutet, bei der eine allenfalls vorhandene schützbbare Gruppe in der Seitenkette durch eine übliche Schutzgruppe substituiert sein kann,

n 0 oder 1 ist, und

15

R_2 eine Gruppe Bz, Bzl, Ac, Boc, Z, Suc, MeoSuc oder Tos bedeutet,

mit der Massgabe, dass nicht gleichzeitig n 0 ist und R_1 $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$, R_2 Z und (AA_2) unsubstituiertes oder durch Boc substituiertes Lysin bedeuten, als Racemate oder als enantiomerenreine Isomere, und deren Salze mit Mineralsäuren oder organischen Säuren.

20

2. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin AA_2 Lys(ϵ -Z), Lys(ϵ -Boc), Lys(ϵ -Ac), Lys(ϵ -Bz), Lys(ϵ -Bzl), Lys(ϵ -Tos), Orn(δ -Z), Orn(δ -Boc), Orn(δ -2-chlor-Z), Orn(δ -Dnp), Orn(δ -Z), Orn(δ -Aloc), Arg(ω -Pbf), Arg(δ,ω -Boc)₂, Arg(δ,ω -Z)₂, Arg(ω -Tos), His(N^{im} -Boc), His(N^{im} -Ac), His(N^{im} -Bz), His(N^{im} -Bzl) oder His(N^{im} -Tos) bedeutet, wobei Lys(ϵ -Z) bevorzugt ist

25

3. Verbindungen gemäss Anspruch 1 oder 2, worin AA_3 Ala, Ser, Phe, Val, Ile, Leu, Thr, Pro, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys, Met, Trp, Tyr oder Gly bedeuten, wobei eine allenfalls vorhandene schützbbare Gruppe in der Seitenkette durch eine übliche Schutzgruppe, wie tBu, Bzl oder Ac substituiert sein kann.

30

4. Verbindungen gemäss Anspruch 3, worin AA_3 Phe, Ala, Val oder gegebenenfalls durch tBu, Bzl oder Ac geschütztes Ser bedeutet.

5. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin

R₁ NHC(NH)NH₂,

AA₂ Val, Lys(ε-Z) oder Lys(ε-Boc),

5 AA₃ Ala, Ser, Phe, Val, Ser(tBu), Ser(Bzl) oder Ser(Ac),

n 0 oder 1 und

R₂ Bz, Boc oder Z bedeuten.

6. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin

10 R₁ CH₂NH₂,

AA₂ Val, Lys(ε-Z) oder Lys(ε-Boc),

AA₃ Ala, Ser, Phe, Val, Ser(tBu), Ser(Bzl) oder Ser(Ac),

n 0 oder 1 und

R₂ Bz, Boc oder Z bedeuten.

15

7. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass diese als Säureadditionssalze in Form von Hydrobromiden, Hydrochloriden, Trifluoracetaten oder Acetaten vorliegen.

20 8. Verwendung der Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7 als Substrate für die Bestimmung von TAFIa.

9. Verfahren zur Bestimmung von TAFIa, dadurch gekennzeichnet, dass man TAFIa in Gegenwart von 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) auf eine Verbindung
25 gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7 einwirken lässt und die dabei durch die Bildung von 3-Carboxy-4-nitrothiophenol entstehende Absorption zwischen 400 und 412 nm in Abhängigkeit von der Zeit photospektrometrisch ermittelt.

10. Verfahren gemäss Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Einwirkung
30 während 5 bis 15 Minuten, insbesondere während 10 Minuten bei einer Temperatur von 10°C bis 37°C, insbesondere bei Raumtemperatur erfolgt.

11. Verfahren gemäss Anspruch 9 oder 10 dadurch gekennzeichnet, dass als Quelle für TAFIa das im Blutplasma vorhandene TAFI verwendet wird.

35

12. Verfahren zur Herstellung der in Anspruch 1 definierten Formel I, dadurch gekennzeichnet, dass man einen entsprechenden Alkylester alkalisch verseift.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CH/00670

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K5/06 C07K5/08 C12Q1/56

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HONG ET AL: "Development of substrate for carboxypeptidase-B by employing thiaarginine peptides" BULLETIN OF THE KOREAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 19, no. 2, 1998, pages 189-193, XP008018429 cited in the application * Siehe Seite 189 ("Scheme 1") und Seite 192 ("Discussion") * ----- -/--	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 June 2003

Date of mailing of the international search report

30/06/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Korsner, S-E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/02/00670

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BOFFA ET AL: "Plasma and recombinant thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, thrombin/thrombomodulin-dependent activation, thermal stability, and enzymatic properties" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 4, 23 January 1998 (1998-01-23), pages 2127-2135, XP002183690 ISSN: 0021-9258 * Siehe Seite 2131 (GEMSA) *</p>	1-12

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C07K5/06 C07K5/08 C12Q1/56

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C07K C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>HONG ET AL: "Development of substrate for carboxypeptidase-B by employing thiaarginine peptides" BULLETIN OF THE KOREAN CHEMICAL SOCIETY, Bd. 19, Nr. 2, 1998, Seiten 189-193, XP008018429 in der Anmeldung erwähnt * Siehe Seite 189 ("Scheme 1") und Seite 192 ("Discussion") *</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Juni 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/06/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Korsner, S-E

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BOFFA ET AL: "Plasma and recombinant thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, thrombin/thrombomodulin-dependent activation, thermal stability, and enzymatic properties"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 273, Nr. 4, 23. Januar 1998 (1998-01-23), Seiten 2127-2135, XP002183690 ISSN: 0021-9258 * Siehe Seite 2131 (GEMSA) *</p> <p>-----</p>	1-12